

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-46770

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月23日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

1/19

1/19

1/21

1/21

5/10

C 1 2 P 23/00

C 1 2 P 23/00

C 1 2 N 5/00

C

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-213648

(22) 出願日 平成9年(1997) 8月7日

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 三 沢 典 彦

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

麦酒株式会社基盤技術研究所内

(72) 発明者 正 元 和 盛

熊本県熊本市黒髪2-40-1

(72) 発明者 金 子 貴 一

千葉県木更津市矢那内野1523-3

(72) 発明者 藤 博 幸

大阪府吹田市古江台6-2-3

(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 β -カロチンヒドロキシラーゼ遺伝子およびその使用

(57) 【要約】

【課題】 種々の生物由来の β -カロチンヒドロキシラーゼと相同性を有さない同酵素活性タンパク質をコードする新規遺伝子およびその使用法を提供する。

【解決手段】 典型的にはラン藻に由来し、 β -イオノン環の3位(または3'位)に水酸基を導入する酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。上記の遺伝子を宿主(微生物または植物)に導入してこれを発現させ、該宿主中の β -イオノン環を有する化合物における該環の3位(および/または3'位)に水酸基を導入することを特徴とする、キサントフィルの発現もしくは製造方法。

【効果】 上記遺伝子を微生物や植物に導入することにより、ゼアキサントシンや β -クリプトキサントシン等のキサントフィルおよびこれらのキサントフィルの代謝物の生産量を増やすことができる。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1で示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつβ-イオン環の3位(および/または3'位)に水酸基を導入する酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項2】配列番号1で示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子を宿主に導入してこれを発現させ、宿主中のβ-イオン環を有する化合物における該環の3位(および/または3'位)に水酸基を導入することを特徴とする、キサントフィルの発現もしくは製造方法。

【請求項3】配列番号1で示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子を宿主に導入してこれを発現させ、宿主中のβ-カロチンをβ-クリプトキサントフィルまたはこれを経てゼアキサントフィルに変換することを特徴とする、請求項2記載のキサントフィルの発現もしくは製造方法。

【請求項4】宿主がβ-カロチンを産生している植物または微生物である、請求項2または3記載の方法。

【請求項5】植物または微生物がトマト、ニンジン、トウモロコシ、カンキツ類、タバコ、または *Phaffia* 属酵母である、請求項4記載の方法。

【請求項6】宿主がβ-カロチンを産生しない微生物であり、β-カロチンの産生に関与する遺伝子を該宿主に更に導入する請求項2または3記載の方法。

【請求項7】β-カロチンを産生しない微生物が大腸菌、*Zymomonas* 属細菌、*Saccharomyces* 属酵母、または *Candida* 属酵母である、請求項6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】【発明の背景】

【発明の属する技術分野】本発明は、β-イオン環を有する化合物に水酸基を導入する酵素をコードする遺伝子、代表的にはラン藻に由来する遺伝子、およびその遺伝子を用いてβ-カロチン等の環状カロチノイドに水酸基を導入する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】カロチノイド(carotenoid、カロテノイドとも呼ばれる)とは、通常、炭素鎖が40のイソプレン骨格からなる自然界に豊富に存在する天然色素の総称である。現在までに、約600種類のカロチノイドが単離されている(Pfander, H., ed., Key to Carotenoids. Basel, Birkhauser, 1987)。カロチノイドは、植物や光合成微生物では必須の色素であり、光合成の補助色素とし

て機能するほか、光酸化的障害から組織や細胞を保護する機能を担っている。本色素は、また、黄色や赤色の天然着色料として利用され、さらに、癌予防や免疫賦活性などを有する栄養価改善剤として食用や飼料用にすでに一部実用化され、将来の発展が有望視されているものである(松野隆男、幹渉、動物におけるカロテノイドの生理機能と生物活性、化学と生物、28、219-227、1990)。

【0003】カロチノイドは、ステロール、キノン、及びその他のイソプレノイドと共通なイソプレン基本生成経路によって合成される。最初のイソプレノイドであるC5のイソペンテニルピロリン酸(IPP)は異性化反応によりジメチルアリルピロリン酸(DMAPP)に変換され、さらに、DMAPPは、C5のIPPと順次、縮合することにより、C10のゲラニルピロリン酸(GPP)、C15のファルネシルピロリン酸(FPP)、C20のゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)というふうに、炭素数を5つつつ延ばしていく。カロチノイドに特異的な生成経路は、GGPPにおいてイソプレン基本生成経路から分岐する。すなわち、2分子のGGPPが縮合して、最初のカロチノイドである無色のフィトエン(phytoene)が合成される。フィトエンは、不飽和化反応により、順次、二重結合が導入されることにより、フィトフルエン(phytofluene; フィトエンに二重結合1個)、ε-カロチン(ε-carotene; 二重結合2個)、ノイロスポレン(neurosporene; 二重結合3個)、リコペン(lycopene; 二重結合4個)に変換される。さらに、リコペンは環化反応によりβ-カロチン(β-carotene)やα-カロチン(α-carotene)に変換される。そして、β-カロチンやα-カロチンに水酸基やケトン基などが導入され、ゼアキサントフィル(zeaxanthin)、ルテイン(lutein)、アスタキサントフィル(astaxanthin)などの種々のキサントフィルが合成される。

【0004】カロチノイドの生合成を担う遺伝子の知見は、1990年代に入って飛躍的に進展した。現在までに、多くのカロチノイド生合成遺伝子が、植物常在(epiphytic)細菌 *Erwinia* やトマト、赤ピーマンなどの植物を始めとして、光合成細菌 *Rhodobacter*、ラン藻 *Synechococcus* sp. strain PCC7942、カビ *Neurospora crassa* など、種々の生物から単離され、それらの機能が明らかにされた(三沢典彦、遺伝子レベルで解明されたカロチノイド生合成経路、蛋白質 核酸 酵素、41、337-346、1996)。したがって、取得された種々のカロチノイド生合成遺伝子を利用して、遺伝子工学的手法により大腸菌や酵母などの微生物、さらには植物などを形質転換し発現させることによって、種々の生物に、カロチノイドの生合成能を新たに付与したり、カロチノイドの代謝経路を変えたりすることが可能となった(三沢典彦、セミナー متابリックエンジニアリングの展開 -2、大腸菌・酵母によるカロテノイド生産、化学と生物、35、

60-68, 1997, および、三沢典彦, イソプレノイド生合成遺伝子による植物の代謝工学, 第33回 植物化学シンポジウム 講演要旨集, 22-32, 1997)。

【0005】 β -カロチンを β -クリプトキサンチンを経てゼアキサンチンに変換する酵素である β -カロチンハイドロキシラーゼ (β -carotene hydroxylase) をコードする遺伝子 (crtZ またはbhy) は、植物常在細菌 *Erwinia*、*Flavobacterium* 属細菌、海洋細菌 *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. strain PC-1、植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から取得されている (N. Misawa, Y. Satomi, K. Kondo, A. Yokoyama, S. Kajiwar, T. Saito, T. Ohtani, W. Miki, Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol., 177, 6575-6584, 1995、および、Z. Sun, E. Gantt, F. X. Cunningham, Jr., Cloning and functional analysis of the β -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*, J. Biol. Chem., 271, 24349-24352, 1996、および、L. Pasamontes, D. H. Uqu, M. Tessier, H.-P. Hohmann, J. Schierle, A. P. G. A. M. van Loon, Isolation and characterization of the carotenoid biosynthesis genes of *Flavobacterium* sp. strain R1534, Gene, 185, 35-41, 1997)。これらの β -カロチンハイドロキシラーゼは、種を超えて、アミノ酸配列レベルでよく保存されていた。たとえば、*Erwinia* と海洋細菌のCrtZは53-56%の同一のアミノ酸配列を有しており、これらの細菌と植物 *Arabidopsis* の β -カロチンハイドロキシラーゼは、31-37%の同一のアミノ酸配列を有していた。

【0006】カロチノイドは、炭素と水素のみからなる"カロチン" (たとえば、リコペン、 β -カロチン、 α -カロチン等)、及び、カロチンに水酸基、ケト基などの酸素を含む基が導入された"キサントフィル" (たとえば、ゼアキサンチン、ルテイン、アスタキサンチン等) からなりたっている。一般的に言って、キサントフィルは、カロチンと比べると、水溶性が若干あるため、癌予防や免疫賦活性などの生理活性が高いと考えられている (西野輔翼, 食品中のカロテノイドによる発癌抑制, 農化誌, 67, 39-41, 1993)。

【0007】〔発明の概要〕

〔発明が解決しようとする課題〕上記事情に鑑み、カロチン、特に食品に最もよく含まれているカロチンである β -カロチンを β -クリプトキサンチンやゼアキサンチンに変換する技術の開発が望まれる。本発明の課題は、前述した種々の生物由来の β -カロチンハイドロキシラーゼと同様の活性を持ちながら、これらの β -カロチンハイドロキシラーゼとアミノ酸配列レベルで相同性を有さない酵素をコードする遺伝子を見出し、これを用いて、 β -カロチン等の β -イオノン環の3位(および/

または3'位)に水酸基を導入し、 β -クリプトキサンチンやゼアキサンチン等のキサントフィルを合成する方法を提供することである。

【0008】

〔課題を解決するための手段〕ラン藻 *Synechocystis* sp. strain PCC6803は、そのゲノム情報が明らかにされた唯一のラン藻である (T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka et al., Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res. 3, 109-136, 1996)。

一方、*Synechocystis* PCC6803は、ゼアキサンチン、エキネノン、ミキソキサントフィル等のキサントフィルを生産することができる。それゆえ、本ラン藻はゼアキサンチンを作るための β -カロチンハイドロキシラーゼ遺伝子を有するはずであるが、相同性検索の結果、既存の β -カロチンハイドロキシラーゼと類似性のあるタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (ORF)は見出されなかった。したがって、*Synechocystis* PCC6803の β -カロチンハイドロキシラーゼ遺伝子は、既存の β -カロチンハイドロキシラーゼとは少なくとも構造の違う酵素をコードしていると考えられる。発明者らは、*Synechocystis* PCC6803のゲノム上に推定された3,166個のタンパク質をコードしうるORFの中から、 β -カロチンを β -クリプトキサンチンを経てゼアキサンチンに変換する β -カロチンハイドロキシラーゼをコードするORF s111468を見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明による遺伝子は、配列番号1で示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ β -イオノン環の3位(および/または3'位)に水酸基を導入する酵素活性を有するポリペプチド (β -カロチンハイドロキシラーゼ) をコードするものである。また本発明は、上記の遺伝子を用いたキサントフィルの発現もしくは製造方法をも提供する。すなわち、本発明によるキサントフィルの発現もしくは製造方法は、配列番号1で示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子を宿主に導入してこれを発現させ、宿主中の β -イオノン環を有する化合物における該環の3位(および/または3'位)に水酸基を導入することを特徴とするものであり、好ましい具体的態様は、該遺伝子を宿主に導入してこれを発現させ該宿主中の β -カロチンを β -クリプトキサンチンまたはこれを経てゼアキサンチンに変換することを特徴とするものである。

【0010】上記の方法により、たとえば、もともと従

来型のβ-カロチンハイドロキシラーゼ遺伝子を有している微生物や植物に本発明によるβ-カロチンハイドロキシラーゼ遺伝子を導入しても、相同組み換えやco-suppression等の問題を気にすることなく、これらの微生物や植物においてβ-カロチンハイドロキシラーゼ活性を付与または増大させることができる。

【0011】〔発明の具体的な説明〕

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は遺伝子は、配列番号1で示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド(β-カロチンハイドロキシラーゼ)をコードするものであることは前記したところであり、その典型的な例は配列番号1のアミノ酸配列をコードするラン藻由来の遺伝子である。また本発明は、上記遺伝子を用いたキサントフィルの発現もしくは製造方法に関し、このキサントフィルの製造方法は、上記遺伝子を宿主に導入してこれを発現させ、該宿主中のβ-イオノン環を有する化合物における該環の3位(および/または3'位)に水酸基を導入することを特徴とするものである。本発明方法の好ましい具体的態様は、上記遺伝子を宿主に導入して発現させ、該宿主中のβ-カロチンをβ-クリプトキサンチンまたはこれを経てゼアキサンチンに変換することを特徴とする方法である。

【0012】本発明方法において、宿主がβ-カロチンを産生している(蓄積している)場合、好適な例としてトマト、ニンジン、トウモロコシ、カンキツ類、タバコ、*Phaffia*属酵母などでは、β-カロチン生成に関与する遺伝子はすでに存在しているため本発明遺伝子のみを宿主細胞に導入すればよい。また、宿主がβ-カロチンを産生していない場合、本発明遺伝子の他に、β-カロチン生成に関与する不足の遺伝子、すなわち、カロチノイド生合成遺伝子 crtE 、 crtB 、 crtI 、 crtY の全部または一部を導入する必要がある。例えば、本発明において好ましい宿主である大腸菌、*Zymomonas*属細菌、*Saccharomyces*属酵母、*Candida*属酵母の場合は、上記のカロチノイド生合成遺伝子を保有していないか、 crtE と同様の働きをする遺伝子を保有している場合でもその活性が弱いのでそれらの遺伝子すべてを導入する必要がある。

【0013】カロチノイド生合成遺伝子である crtE 、 crtB 、 crtI 、 crtY は、公知の種々の生物由来、たとえば植物常在細菌*Erwinia*(たとえば*Erwinia uredovora*)、海洋細菌(たとえば*Agrobacterium aurantiacum*)、*Alcaligenes* sp. strain PC-1等に由来するものを用いることができ、これらの具体的な配列については、例えばN. Misawa et al., J. Bacteriol. 1

72, 6704-6712, 1990, N. Misawa et al., J. Bacteriol., 177, 6575-6584, 1995等に記載されている。具体的に例示すれば、 crtE は本願明細書の配列番号4のアミノ酸番号1~302、 crtB は配列番号3のアミノ酸番号1~296、 crtI は配列番号5のアミノ酸番号1~492、 crtY は配列番号6のアミノ酸番号1~382または配列番号2の1~386、でそれぞれ示されるアミノ酸配列およびそれらの変異体(例えば1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有しかつ同じ酵素活性を有するタンパク質)をコードする遺伝子を使用することができる。

【0014】本発明遺伝子および上記の各種 crt 遺伝子を取得する一つの手段は、核酸合成の方法に従って、その鎖長の少なくとも一部を化学合成することであるが、遺伝子のサイズが大きいく数が多いということを考えれば、この化学合成法よりも染色体DNAライブラリーを作製し、このライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば適当なプローブ(たとえば、化学合成したDNAプローブなど)によるハイブリダイゼーション法、によりこれを取得するほうが早いといえる。

【0015】<ラン藻*Synechocystis* sp. strain PCC6803のゲノム情報>*Synechocystis* sp. strain PCC6803(以下PCC6803)は単細胞性のラン藻で、約3.6 Mbの環状ゲノムを持っている(金子貴一、中村保一、田畑哲之、ラン藻ゲノムの全構造解明がもたらすもの、化学と生物、34, 786-792, 1996)。1996年の2月に、光合成生物としては始めてPCC6803ゲノムの全塩基配列が決定され、9月には、配列データーとコンピューターによる解析データーが公開された(T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka et al., Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res. 3, 109-136, 1996)。現在では、PCC6803に関するすべてのゲノム情報は、ftp://ftp.kazusa.or.jp/pub/cyano/cyano.p.aa.zにてアクセスすることができる。

【0016】PCC6803のゲノム上には、3,166個のタンパク質をコードしうる遺伝子領域(ORF)が推定された。3,166個のうち、既知の遺伝子と類似性を示したものは1,742個(全体の55%)であり、そのうち機能が予測できるものは1,402個であった。したがって、既知の遺伝子と類似性を示さない未知の遺伝子は1,424個ということになる。β-カロチンをβ-クリプトキサンチンを経てゼアキサンチンに変換するβ-カロチンハイドロキシラーゼをコードするORF s11 1468は、この未知の遺伝子の中から、思いがけず見いだされたものである。

【0017】<ラン藻 PCC6803の β -カロチンハイドロキシラーゼ遺伝子の取得> β -カロチンを β -クリプトキサンチンを経てゼアキサンチンに変換する β -カロチンハイドロキシラーゼをコードするORF s11 1468は、その塩基配列の情報(T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka et al., DNA Res. 3, 109-136, 1996)に基づいて、PCR 反応(林健志 編、実験医学別冊、PCR 法の最新技術、羊土社)や化学合成法等の方法により取得することができる。たとえば、発明者らは、化学合成した以下のDNA 配列をプライマーとして用いたPCR 法により、PCC6803 の染色体DNA 断片からORF s11 1468の配列を単離した。5'-TCC TCG AGC GTG TGC CAG GAG TCC G -3' 5'-ACT CTA GAG CTA GGG CTT GTC AGA TG -3'ここで得られたDNA 断片をXhoI/XbaI で消化後、pBluescript II KS+ (Stratagene) のXhoI-XbaI 部位に挿入し、大腸菌でPCC6803 の β -カロチンハイドロキシラーゼ遺伝子を発現するプラスミドを得た。

【0018】<ラン藻 PCC6803の β -カロチンハイドロキシラーゼを含むプラスミドの作製法、及び各種生物への導入・発現法>次に、前述の単離したORF (本発明の遺伝子を含む)を用いた各種生物での発現用プラスミドの作製法、及びこれらのプラスミドの各種生物への導入・発現法についてさらに詳しく説明する。

【0019】微生物の形質転換および遺伝子発現

以下は、好ましい微生物への外来遺伝子の導入・発現法の概要について記載したものである。外来遺伝子を含むプラスミドの作製法、大腸菌等の微生物へのプラスミドの導入および発現のための手順ないし方法は、本発明において下記したところ以外のものにおいても、遺伝子工学の分野により慣用されているものを含み、その手法ないし方法(たとえば、"Vectors for cloning genes", Methods in Enzymology, 216, p. 469-631, 1992, Academic Press、および、"Other bacterial systems", Methods in Enzymology, 204, p.305-636, 1991, Academic Press 参照)に準じて実施すればよい。組換え微生物の培養は、導入されたプラスミドが有する薬剤耐性等の形質に合わせて、薬剤を添加したりすること以外は、もともとの微生物の親株の培養に準じて行えばよい(たとえば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning -A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989、または、財団法人発育研究所, LIST OF CULTURES 10th Edition, 1996 参照)。

【0020】(1) 大腸菌

大腸菌では、本発明遺伝子の他に β -カロチンの合成に関与する遺伝子 crt E、crt B、crt I、crt Y の導入が必要となる。大腸菌への外来遺伝子の導入法は、ハナハンの方法、ルビジウム法などすでに確立されたいくつかの効率的方法があり、それを用いて行えばよい(たとえば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, "Mol

ecular cloning -A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 参照)。大腸菌での外来遺伝子の発現は常法に従って行えばよい(たとえば、前述の "Molecular cloning -A laboratory manual."参照)、たとえば、pUC 系やpBluescript 系等のlac のプロモーター等を有する大腸菌用ベクターを用いて行うことができる。発明者等は、lac のプロモーターを有する大腸菌用ベクターpBluescript II KS' (Stratagene)を用いて、lac のプロモーターの転写およびlacZ の翻訳のリードスルーを受ける用に PCC6803のORF s11 1468 遺伝子(本発明の遺伝子を含む)および4 種の上記 β -カロチン合成遺伝子)を挿入し、この遺伝子が大腸菌で発現させればよい。なお、本発明遺伝子を含む上記5 種の遺伝子を連結する際のそれらの結合順位は特に限定されない。

【0021】(2) Zymomonas mobilis

Zymomonas mobilis では、本発明遺伝子の他に上記の4 種の crt遺伝子の導入が必要となる。エタノール生産細菌 Zymomonas mobilis への外来遺伝子の導入法は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができ、Zymomonas mobilis での外来遺伝子の発現は、たとえば Zymomonas mobilis 用ベクターpZ22を用いて行うことができる(中村克己、「Zymomonas 細菌の分子育種」、日本農芸化学会誌, 63, p.1016-1018, 1989、および、N. Misawa, S. Yamano, H. Ikenaga, Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1847-1849, 1991参照)。

【0022】(3) 酵母

酵母では、本発明遺伝子の他に上記の4 種の crt遺伝子の導入が必要となる。酵母 Saccharomyces cerevisiae への外来遺伝子の導入法は、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いて行えばよい(たとえば、秋山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊参照)。酵母での外来遺伝子の発現は、PKG や GPD (GAP) 等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子(本発明遺伝子および4 種の crt遺伝子)をこのプロモーターとターミネーターの間に転写のリードスルーを受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、S. cerevisiae のベクター、たとえば、YRp 系(酵母染色体のARS 配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター)、YEpl 系(酵母の2 μ m DNA の複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター)、YIp 系(酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター)等のベクターに挿入することにより行うことができる(前述の「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABC シリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊、および、S. Y

amano, T. Ishii, M. Nakagawa, H. Ikenaga, N. Misawa, Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1112-1114, 1994 参照)。

【0023】酵母 *Candida utilis* への外来遺伝子の導入法については、すでに本発明者らにより開示された方法(近藤、三沢、梶原、特開平8-173170号公報)に従って実施できる。具体的にはシクロヘキシミド耐性遺伝子、G418耐性遺伝子、あるいはハイグロマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性マーカー遺伝子を含んだプラスミドを直鎖状にした後、電気パルス法もしくはリチウム法によって、染色体上に組み込むことができる。外来遺伝子(本発明遺伝子および4種の *crt* 遺伝子)の発現には同公報に記載されたGAP, PGK, PMA などのプロモーターを使用することができる。

【0024】酵母 *Phaffia rhodozyma* への外来遺伝子(本発明遺伝子および4種の *crt* 遺伝子)の導入法については、Van Ooyen らにより、開示された方法(Van Ooyen et al., Transformation of *Phaffia rhodozyma*, WO94/06918, 1994)により、G418耐性遺伝子などの選択マーカー遺伝子を含むプラスミドをリチウム法などによって染色体上に組み込むことができる。

【0025】微生物からのカロチノイド色素の抽出・精製法

培養物からの β -クリプトキサンチン、ゼアキサンチン等のカロチノイドの単離・精製は、微生物代謝生産物をその培養物から単離精製するために常用される方法に従っておこなわれる。例えば、培養物をろ過や遠心分離により培養ろ液と菌体に分け、菌体を有機溶剤(たとえば、アセトン、メタノール、クロロホルムおよびこれらの2種以上の混合物など)で抽出する。ついで抽出液を濃縮後、シリカゲル、化学結合型シリカゲル(ODSゲル等)、ゲルろ過剤などを用いた液体クロマトグラフィーにより精製する。得られたカロチノイドは、着色料、栄養価改善として食用や飼料用に、あるいは試薬用などに用いられる。

【0026】植物の形質転換および遺伝子発現

植物の場合は通常 β -カロチンを産生しているので、本発明遺伝子のみを導入すればよい。前述のPCC6803の本発明 β -カロチンヒドロキシラーゼ遺伝子(ORF s111468)を含むプラスミドを作製し、これをトマト、ニンジン、トウモロコシ、カンキツ類、タバコなどの適切な植物に導入し、発現させることにより、ゼアキサンチンや β -クリプトキサンチンおよびこれらのカロチノイド代謝物を得たり、増やしたりすることができる。微生物の場合は形質転換体で生成したカロチノイドを単離することが主目的である。植物体ではむしろ、果実や花におけるカロチノイド含量を増やしたり、カロチノイドの種類を変化させることにより、栄養価を高めたりカロチノ

イド色を増大させることを主目的とする。

【0027】以下は、植物への外来遺伝子の導入・発現法の概要について記載したものである。外来遺伝子を含むプラスミドの作製法、植物(細胞)へのプラスミドの導入および発現(植物体)のための手順ないし方法は、本発明において下記したところ以外のものにおいても、植物の遺伝子工学の分野により慣用されているものを含み、その手法ないし方法(たとえば、石田功、三沢典彦、細胞工学実験操作入門、講談社、1992 参照)に準じて実施すればよい。

【0028】植物への外来遺伝子の導入法は、植物病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens* を介する方法、エレクトロポレーション法、パーティクルガンを用いる方法等が知られている。導入したい植物の種類に応じてこれらの方法を使い分けることができるが、現在では、*Agrobacterium tumefaciens* を介する方法が最も多用されている。プロモーターは、全身長発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターを始めとして、種々の器官特異的に発現するものも使うことができる。CaMV 35Sプロモーターを含んだバイナリーベクターpBI121はClontech社より入手でき、*Agrobacterium tumefaciens* を介するためのベクターとして、広く使われているものである。*Erwinia* の *crtI* などの細菌のカロチノイド生合成遺伝子は、pBI121をベクターとして用いることにより、タバコやトマト等の植物に導入でき、これらの遺伝子がタバコの葉やトマトの実などで発現し、機能することがすでに示されている(三沢典彦、カロチノイド生合成阻害剤抵抗性植物の作出、植物の化学調節, 31, 143-149, 1996)。なお、この際、植物細胞質内で合成されたCrtタンパク質を、カロチノイド生産の場である葉緑体や色素体などのプラスチドに移行させるのに、トランジットペプチド配列(例えばRubiscoの小サブユニットのトランジットペプチド配列)を *crt* 遺伝子(ここでは本発明遺伝子)の開始コドンの直前に付与する必要がある(三沢典彦、カロチノイド生合成阻害剤抵抗性植物の作出、植物の化学調節, 31, 143-149, 1996)。

【0029】配列番号3~6に関する遺伝子を組み込んだ大腸菌は、下記のように工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-2377として寄託されており、配列番号2に関する遺伝子を組み込んだ大腸菌はBP-4505として寄託されている。

(1) *Escherichia coli* JM109(pCAR1)

受託番号: FERM BP-2377

受託年月日: 平成元年4月11日

(2) *Escherichia coli* JM101(pAccrt-E18, pAK92)

受託番号: FERM BP-4505

受託年月日: 平成5年12月20日

菌株(1)は、*Erwinia uredovora* の *crtE(zexA)*、*crtB(zexE)*、*crtI(zexD)*、*crtY(zexC)*等の遺伝子を含んで

おり、菌株(2)は、*Agrobacterium aurantiacum* の *crtY* 等の遺伝子を含んでいる。

【0030】

【実施例】以下実施例により本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではないことは言うまでもない。

【実施例1】 プラスミドの作製

植物常在 (epiphytic) 細菌 *Erwinia uredovora* の *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* 遺伝子を有するプラスミド pACCAR16Δ*crtX* は大腸菌にβ-カロチンを合成する能力を与え、
 10 ことができる (N. Misawa et al., Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol., 177, 6575-6584, 1995)。このプラスミドは、マーカー遺伝子としてクロラムフェニコール耐性遺伝子を有しており、よく使われている pBluescript や pUC 等の大腸菌ベクターと1つの細胞内で共存可能である。
 PCC6803 ゲノムのコスミドライブラリーの内 ORF s11 1468 (後にβ-カロチンヒドロキシラーゼ遺伝子, *bh*
 20 *y* と同定された)を含むコスミドクローン cs 0827 (T. Kaneko et al., DNA Res. 3, 109-136, 1996) を鋳型として用いて、以下の1本鎖DNAをプライマーとしてPCR反応を行った。

5'-TCC TCG AGC GTG TCC CAG GAG TCC G-3'

5'-ACT CTA GAG CTA CGG CTT GTC AGA TG-3'

【0031】ここで得られた0.94 kb のDNA断片を制限酵素XhoI/XbaIで消化後、pBluescript II KS+ (アンピシリン耐性, Stratagene社)のXhoI-XbaI部位に挿入することによりプラスミドpBS-bhyを得た。塩基配列の分析等により、pBS-bhyは目的とするORF s11 1468
 30 を含んでいることを確認した。なお、このプラスミドでは、ORF s11 1468は、ベクターpBluescript II KS+のlacプロモーターの転写のリードスルーを受けるだけでなく、pBluescript II KS+のlacZの翻訳のリードスルーを受けること、すなわち、LacZの最初のN末領域と融合タンパク質ができるようにデザインされている。

【0032】【実施例2】組換え大腸菌が生産するカロチノイドの同定

2つのプラスミドpACCAR16Δ*crtX*およびpBS-bhyを有する大腸菌を、150 μg/mlのアンピシリン、30 μg/mlのクロラムフェニコール、0.1 mMのイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG)を含むLB培地 (1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1% NaCl) で30℃で24時間、定常期まで培養を行った。集菌後、菌体からカロチノイド色素をアセトンで抽出し、乾固した後、クロロフォルム-メタノール (9:1) で再抽出を行った。乾固後、色素を少量のメタノール、2-プロパノールまたはアセトンに溶かした後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) または薄層クロマトグラフィー
 50

(TLC) のサンプルとした。HPLCは、Nova-pak HR 6 μカラム (300 x 3.9 mm, Waters) を用い、1 ml/minの速度で、アセトニトリル-メタノール-2-プロパノール (90:6:4) で展開を行った。TLCは、シリカゲル (60F254) を用い、クロロフォルム-メタノール (15:1) で展開を行った。β-カロチン (all-trans型) はSigma社から購入したものを標品として用いた。さらに、ゼアキサンチン (all-trans型)、β-クリプトキサンチン (all-trans型)、カンタキサンチン (all-trans型)、エキネノン (all-trans型)は、開示された方法 (N. Misawa et al., J. Bacteriol., 177, 6575-6584, 1995) に従って、*Erwinia*、または*Erwinia*と海洋細菌の*crt*遺伝子を有する組換え大腸菌から精製を行った。

【0033】pACCAR16Δ*crtX*およびpBS-bhyを有する大腸菌から抽出されたカロチノイド色素は、上記の条件でHPLCおよびTLC分析した結果、ゼアキサンチン (all-trans型) (全体の65%)、β-クリプトキサンチン (all-trans型) (全体の5%)、β-カロチン (all-trans型) (全体の24%)の混合物であると同定された。なお、β-カロチンにケト基が導入されたカロチノイドであるカンタキサンチンやエキネンは全く見いだされなかった。したがって、プラスミドpBS-bhyに含まれるORF s11 1468は、β-カロチンを基質として、β-カロチンの3位に水酸基が導入されたカロチノイドであるβ-クリプトキサンチンを経て、さらに、β-クリプトキサンチンの3'位に水酸基が導入されたカロチノイドであるゼアキサンチンを合成する酵素β-カロチンヒドロキシラーゼ (β-carotene hydroxylase) をコードする遺伝子であることがわかった。すなわち、ORF s11 1468は、β-イオン環の3位 (3'位) に水酸基を導入する酵素をコードする遺伝子であることがわかる。

【0034】この結果は全く思いがけないことであった。なぜなら、β-カロチンヒドロキシラーゼをコードする遺伝子 (*crtZ* または*bhy*) は、植物常在細菌 *Erwinia*, *Flavobacterium* 属細菌、海洋細菌 *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. strain PC-1、植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) からすでに取得されているが (N. Misawa, et al., J. Bacteriol., 177, 6575-6584, 1995, および, Z. Sun, et al., J. Biol. Chem., 271, 24349-24352, 1996, および, L. Pasamontes, et al., Gene, 185, 35-41, 1997)、これらのβ-カロチンヒドロキシラーゼは、種を超えて、アミノ酸配列レベルでよく保存されていることがわかっていた。たとえば、*Erwinia*と海洋細菌の*CrtZ*は53-56%の同一のアミノ酸配列を有しており、これらの細菌と植物*Arabidopsis*のβ-カロチンヒドロキシラーゼは、31-37%の同一のアミノ酸配列を有していた。一方、ラン藻 PCC6803のβ-カロチンヒドロキシラーゼ遺伝子と同定されたORF s111468がコードするタンパク質は、上記の種々のβ-カロチンヒドロキシラーゼ

とはアミノ酸レベルで相同性を有していなかった。むしろ、PCC6803 のORF s111468がコードするタンパク質は、海洋細菌 *Agrobacterium aurantiacum* や *Alcaligenes* sp. strain PC-1 のCrtW や緑藻 *Haematococcus pluvialis* のBKT といったβ-カロチンケトラーゼ (β-carotene ketolase) (S. Kajiware, T. Kakizono, T. Saito, K. Kondo, T. Ohtani, N. Nishio, S. Nagai, N. Misawa, Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. Plant Mol. Biol., 29, 343-352, 1995) とアミノ酸配列レベルで意義深い相同性を有していた。そこで、発明者らは、ORF s11 1468は、β-カロチンの4 位にケト基が導入されたエキネノンを経てエキネノンの3'位に水酸基が導入されたカロチノイドであるカンタキサンチンを合成する酵素でβ-カロチンケトラーゼをコードする遺伝子であろうと考え、β-カロチンを合成できる大腸菌を宿主として用いて、上記の*

*実験を行ったのである。その結果、予想に反して思いがけず、ORF s11 1468は、β-カロチンケトラーゼではなくβ-カロチンハイドロキシラーゼをコードする遺伝子であることを発見したのであった。

【0035】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：939

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：*Synechocystis* sp.

株名：PCC6803

配列の特徴：

他の特徴：β-carotene hydroxylase 遺伝子またはbhy (遺伝子名)

配列

GTG TCC CAG GAG TCC GTC ATA GTA ATG CAG CCG ACC CAA CCG CTG CAA	48
Met Cys Gln Glu Ser Val Ile Val Met Gln Ala Thr Gln Pro Leu Gln	
1 5 10 15	
ACC GTT TCC CAA CCT GTC CCA AAA GAG TTT TTA CAG CCG GAC GGC GGC	96
Thr Val Ser Gln Ala Val Pro Lys Glu Phe Leu Gln Ala Asp Gly Gly	
20 25 30	
TTC AAT CCC AAC GTG CCC ATG TTC GGG ATA GCT ATT CTC TTA ATG CTC	144
Phe Asn Pro Asn Val Ala Met Phe Gly Ile Ala Ile Leu Leu Met Leu	
35 40 45	
GCT AAC GTT TTT GGC TAC TGG CAA TGG GGG CTG CCC CAC TGG CTT TGT	192
Ala Asn Val Phe Gly Tyr Trp Gln Trp Gly Leu Pro His Trp Leu Cys	
50 55 60	
TTT AGT TGT TCG GTG CTG GCG CTG CAC CTG TCA GCG ACA GTG ATC CAT	240
Phe Ser Cys Ser Val Leu Ala Leu His Leu Ser Gly Thr Val Ile His	
65 70 75 80	
GAT GCA TCC CAC AAT CCG GCC CAT CCG AAC ACC ATT ATT AAT GCA GTG	288
Asp Ala Ser His Asn Ala Ala His Arg Asn Thr Ile Ile Asn Ala Val	
85 90 95	
CTT GGC CAC GGT AGT GCC TTA ATG TTG GGC TTT GCT TTT CCC GTC TTT	336
Leu Gly His Gly Ser Ala Leu Met Leu Gly Phe Ala Phe Pro Val Phe	
100 105 110	
ACC CCG GTT CAT CTC CAA CAC CAC GCC AAC GTC AAT GAC CCT GAA AAT	384
Thr Arg Val His Leu Gln His His Ala Asn Val Asn Asp Pro Glu Asn	
115 120 125	
GAC CCA GAC CAT TTT GTT TCC ACC GGC GGT CCC CTC TTC CTC ATT GCC	432
Asp Pro Asp His Phe Val Ser Thr Gly Gly Pro Leu Phe Leu Ile Ala	
130 135 140	
CCC CCG TTC TTC TAC CAT GAG ATC TTT TTC TTT AAA CCG CCG TTA TGG	480
Ala Arg Phe Phe Tyr His Glu Ile Phe Phe Phe Lys Arg Arg Leu Trp	
145 150 155 160	
CGC AAA TAT GAG CTA CTA GAG TGG TTC TTA AGT CCG CTT GTG TTG TTC	528

15	16
Arg Lys Tyr Glu Leu Leu Glu Trp Phe Leu Ser Arg Leu Val Leu Phe	
165	170 175
ACG ATC GTT TTT CTC GGC ATT CAT TAC GGC TTT ATC GGC TTT GTG ATG	576
Thr Ile Val Phe Leu Gly Ile His Tyr Gly Phe Ile Gly Phe Val Met	
180	185 190
AAT TAC TGG TTT GTG CCT GCT TTA ATT GTT GGC ATT GCC CTG GGA CTG	624
Asn Tyr Trp Phe Val Pro Ala Leu Ile Val Gly Ile Ala Leu Gly Leu	
195	200 205
TTT TTT GAT TAC CTG CCC CAT CGA CCT TTC CAA GAA CGC AAC CGT TGG	672
Phe Phe Asp Tyr Leu Pro His Arg Pro Phe Gln Glu Arg Asn Arg Trp	
210	215 220
AAA AAT GCC AGG GTT TAT CCC AGC CCC ATT TTA AAT TGG CTC ATT TTC	720
Lys Asn Ala Arg Val Tyr Pro Ser Pro Ile Leu Asn Trp Leu Ile Phe	
225	230 235 240
GGG CAA AAT TAC CAC CTG ATC CAC CAC CTT TGG CCT TCT ATT CCT TGG	768
Gly Gln Asn Tyr His Leu Ile His His Leu Trp Pro Ser Ile Pro Trp	
245	250 255
TAT CAG TAC CAA AAC ACC TAT CAC ATC ACC AAG CCC ATT TTG GAT GAG	816
Tyr Gln Tyr Gln Asn Thr Tyr His Ile Thr Lys Pro Ile Leu Asp Glu	
260	265 270
AAG GGT TGT GAT CAA TCC CTG GGA TTA CTG GAA GGG AAA AAT TTC TGG	864
Lys Gly Cys Asp Gln Ser Leu Gly Leu Leu Glu Gly Lys Asn Phe Trp	
275	280 285
AGC TTC CTC TAT GAT GTT TTC CTT GGT ATT CGT TTT CAC GGC CAT AAT	912
Ser Phe Leu Tyr Asp Val Phe Leu Gly Ile Arg Phe His Gly His Asn	
290	295 300
AAT TCT CAA TCA TCT GAC AAG CCC TAG	939
Asn Ser Gln Ser Ser Asp Lys Pro***	
305	

【0036】配列番号：2

配列の長さ：1161

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

30* 起源：

生物名：Agrobacterium aurantiacum

配列の特徴：

他の情報：crtY（遺伝子名）

*

配列

GTG ACC CAT GAC GTG CTG CTG GCA GCG GCG GCG CTT GCC AAC GCG CTG	48
Met Thr His Asp Val Leu Leu Ala Gly Ala Gly Leu Ala Asn Gly Leu	
1	5 10 15
ATC GCC CTG GCG CTG GCG GCG GCG GCG CCC GAC CTG GCG GTG CTG CTG	96
Ile Ala Leu Ala Leu Arg Ala Ala Arg Pro Asp Leu Arg Val Leu Leu	
20	25 30
CTG GAC CAT GCC GCA GGA CCG TCA GAC GGC CAC ACC TGG TCC TGC CAC	144
Leu Asp His Ala Ala Gly Pro Ser Asp Gly His Thr Trp Ser Cys His	
35	40 45
GAC CCC GAC CTG TCG CCG GAC TGG CTG GCG GCG CTG AAG CCC CTG GCG	192
Asp Pro Asp Leu Ser Pro Asp Trp Leu Ala Arg Leu Lys Pro Leu Arg	
50	55 60
CGC GCC AAC TGG CCC GAC CAG GAG GTG GCG TTT CCC GCG CAT GCC GCG	240
Arg Ala Asn Trp Pro Asp Gln Glu Val Arg Phe Pro Arg His Ala Arg	
65	70 75 80

17	18
CGG CTG GCC ACC GGT TAC GGG TCG CTG GAC GGG GCG GCG CTG GCG GAT	288
Arg Leu Ala Thr Gly Tyr Gly Ser Leu Asp Gly Ala Ala Leu Ala Asp	
85 90 95	
CGG GTG GTC CCG TCG GCG GCG GAG ATC CCG TGG GAC ACC GAC ATC GCG	336
Ala Val Val Arg Ser Gly Ala Glu Ile Arg Trp Asp Ser Asp Ile Ala	
100 105 110	
CTG CTG GAT CCG CAG GCG GCG ACC CTG TCC TGC GCG ACC CCG ATC GAG	384
Leu Leu Asp Ala Gln Gly Ala Thr Leu Ser Cys Gly Thr Arg Ile Glu	
115 120 125	
CGG GCG GCG GTC CTG GAC GGG CCG GCG GCG CAG CCG TCG CCG CAT CTG	432
Ala Gly Ala Val Leu Asp Gly Arg Gly Ala Gln Pro Ser Arg His Leu	
130 135 140	
ACC GTG GGT TTC CAG AAA TTC GTG GGT GTC GAG ATC GAG ACC GAC GCG	480
Thr Val Gly Phe Gln Lys Phe Val Gly Val Glu Ile Glu Thr Asp Arg	
145 150 155 160	
CCC CAC GCG GTG CCC CCG CCG ATG ATC ATG GAC GCG ACC GTC ACC CAG	528
Pro His Gly Val Pro Arg Pro Met Ile Met Asp Ala Thr Val Thr Gln	
165 170 175	
CAG GAC GCG TAC CCG TTC ATC TAT CTG CTG CCC TTC TCT CCG ACC GCG	576
Gln Asp Gly Tyr Arg Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Phe Ser Pro Thr Arg	
180 185 190	
ATC CTG ATC GAG GAC ACC CCG TAT TCC GAT GCG GCG GAT CTG GAC GAC	624
Ile Leu Ile Glu Asp Thr Arg Tyr Ser Asp Gly Gly Asp Leu Asp Asp	
195 200 205	
GAC GCG CTG CCG GCG GCG TCC CAC GAC TAT GCG CCG CAG CAG GCG TGG	672
Asp Ala Leu Ala Ala Ala Ser His Asp Tyr Ala Arg Gln Gln Gly Trp	
210 215 220	
ACC GCG GCG GAG GTC CCG CCG GAA CCG GCG ATC CTT CCC ATC GCG CTG	720
Thr Gly Ala Glu Val Arg Arg Glu Arg Gly Ile Leu Pro Ile Ala Leu	
225 230 235 240	
GCG CAT GAT CCG GCG GCG TTC TGG GCG GAT CAC GCG GCG GCG CCT GTT	768
Ala His Asp Ala Ala Gly Phe Trp Ala Asp His Ala Ala Gly Pro..Val	
245 250 255	
CCC GTG GGA CTG CCG GCG GCG TTC TTT CAT CCG GTC ACC GCG TAT TCG	816
Pro Val Gly Leu Arg Ala Gly Phe Phe His Pro Val Thr Gly Tyr Ser	
260 265 270	
CTG CCC TAT CCG GCA CAG GTG GCG GAC GTG GTG GCG GGT CTG TCC GCG	864
Leu Pro Tyr Ala Ala Gln Val Ala Asp Val Val Ala Gly Leu Ser Gly	
275 280 285	
CCG CCC GCG ACC GAC CCG CTG CCG GCG GCG ATC CCG GAT TAC GCG ATC	912
Pro Pro Gly Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ala Ile Arg Asp Tyr Ala Ile	
290 295 300	
GAC CCG GCG CCG CCG GAC CCG TTT CTG CCG CTT TTG AAC CCG ATG CTG	960
Asp Arg Ala Arg Arg Asp Arg Phe Leu Arg Leu Leu Asn Arg Met Leu	
305 310 315 320	
TTC CCC GCG TGC CCG CCC GAC CCG CCG TAT ACC CTG CTG CAG CCG TTC	1008
Phe Arg Gly Cys Ala Pro Asp Arg Arg Tyr Thr Leu Leu Gln Arg Phe	
325 330 335	
TAC CCG ATG CCG CAT GGA CTG ATC GAA CCG TTC TAT CCG GCG CCG CTG	1056
Tyr Arg Met Pro His Gly Leu Ile Glu Arg Phe Tyr Ala Gly Arg Leu	

(11)

特開平 1 1 - 4 6 7 7 0

19 20

340 345 350

AGC GTG GCG GAT CAG CTG CCC ATC GTG ACC GCG AAG CCT CCC ATT CCC 1104
 Ser Val Ala Asp Gln Leu Arg Ile Val Thr Gly Lys Pro Pro Ile Pro

355 360 365

CTT GCG ACG GCC ATC CGC TGC CTG CCC GAA CGT CCC CTG CTG AAG GAA 1152
 Leu Gly Thr Ala Ile Arg Cys Leu Pro Glu Arg Pro Leu Leu Lys Glu

370 375 380

AAC GCA TGA 1161
 Asn Ala ***

385

【 0 0 3 7 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 8 9 1

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

* 起源 :

生物名 : Erwinia uredovora

配列の特徴 :

他の情報 : crtB (遺伝子名)

*

配列

ATG GCA GTT GCG TCG AAA AGT TTT GCG ACA GCC TCA AAG TTA TTT GAT 48
 Met Ala Val Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp

1 5 10 15

GCA AAA ACC CGG CGC AGC GTA CTG ATG CTC TAC GCC TGG TGC CGC CAT 96
 Ala Lys Thr Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His

20 25 30

TGT GAC GAT GTT ATT GAC GAT CAG ACG CTG GCG TTT CAG GCC CGG CAG 144
 Cys Asp Asp Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln

35 40 45

CCT GCC TTA CAA ACG CCC GAA CAA CGT CTG ATG CAA CTT GAG ATG AAA 192
 Pro Ala Leu Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys

50 55 60

ACG CCG CAG GCC TAT GCA GGA TCG CAG ATG CAC GAA CCG GCG TTT GCG 240
 Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala

65 70 75 80

GCT TTT CAG GAA GTG GCT ATG GCT CAT GAT ATC GCC CCG GCT TAC GCG 288
 Ala Phe Gln Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala

85 90 95

TTT GAT CAT CTG GAA GCG TTC GCC ATG GAT GTA CCC GAA CCG CAA TAC 336
 Phe Asp His Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr

100 105 110

AGC CAA CTG GAT GAT ACG CTG CCC TAT TGC TAT CAC GTT GCA GCG GTT 384
 Ser Gln Leu Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val

115 120 125

GTC GCG TTG ATG ATG CCG CAA ATC ATG GCG GTG CCG GAT AAC GCC ACG 432
 Val Gly Leu Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr

130 135 140

CTG GAC CGC GCC TGT GAC CTT GGG CTG GCA TTT CAG TTG ACC AAT ATT 480
 Leu Asp Arg Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile

145 150 155 160

GCT CCC GAT ATT GTG GAC GAT GCG CAT GCG GCG CCG TGT TAT CTG CCG 528
 Ala Arg Asp Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro

165 170 175

GCA ACC TGG CTG GAG CAT GAA GGT CTG AAC AAA GAG AAT TAT GCG GCA 576

21	22
Ala Ser Trp Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala	
180 185 190	
CCT GAA AAC CGT CAG CCG CTG AGC CGT ATC CCC CGT CGT TTG GTG CAG	624
Pro Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln	
195 200 205	
GAA GCA GAA CCT TAC TAT TTG TCT GCC ACA GCC GCC CTG GCA GGG TTG	672
Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu	
210 215 220	
CCC CTG CGT TCC GCC TGG GCA ATC GCT ACG CCG AAG CAG GTT TAC CCG	720
Pro Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg	
225 230 235 240	
AAA ATA GGT GTC AAA GTT GAA CAG GCC GGT CAG CAA GCC TGG GAT CAG	768
Lys Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln	
245 250 255	
CGG CAG TCA ACG ACC ACG CCC GAA AAA TTA ACG CTG CTG CTG GCC GCC	816
Arg Gln Ser Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala	
260 265 270	
TCT GGT CAG GCC CTT ACT TCC CGG ATG CGG GCT CAT CCT CCC CGC CCT	864
Ser Gly Gln Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro	
275 280 285	
CCG CAT CTC TGG CAG CGC CCG CTC TAG	891
Ala His Leu Trp Gln Arg Pro Leu *	
290 295	

【0038】配列番号：4

配列の長さ：909

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

* 起源：

生物名：Erwinia uredovora

配列の特徴：

他の情報：crtE（遺伝子名）

*

配列

ATG ACG GTC TGC GCA AAA AAA CAC GTT CAT CTC ACT CGC GAT GCT GCG	48
Met Thr Val Cys Ala Lys Lys His Val His Leu Thr Arg Asp Ala Ala	
1 5 10 15	
GAG CAG TTA CTG GCT GAT ATT GAT CGA CGC CTT GAT CAG TTA TTG CCC	96
Glu Gln Leu Leu Ala Asp Ile Asp Arg Arg Leu Asp Gln Leu Leu Pro	
20 25 30	
GTG GAG CGA GAA CCG GAT GTT GTG GGT GCC CCG ATG CGT GAA GGT GCG	144
Val Glu Gly Glu Arg Asp Val Val Gly Ala Ala Met Arg Glu Gly Ala	
35 40 45	
CTG GCA CCG CGA AAA CGT ATT CGC CCC ATG TTG CTG TTG CTG ACC GCC	192
Leu Ala Pro Gly Lys Arg Ile Arg Pro Met Leu Leu Leu Thr Ala	
50 55 60	
CCC GAT CTG GGT TGC GCT GTC AGC CAT GAC CGA TTA CTG GAT TTG GCC	240
Arg Asp Leu Gly Cys Ala Val Ser His Asp Gly Leu Leu Asp Leu Ala	
65 70 75 80	
TGT GCG GTG GAA ATG GTC CAC GCG GCT TCG CTG ATC CTT GAC GAT ATG	288
Cys Ala Val Glu Met Val His Ala Ala Ser Leu Ile Leu Asp Asp Met	
85 90 95	
CCC TGC ATG GAC GAT GCG AAG CTG CCG CGC CGA CCC CCT ACC ATT CAT	336
Pro Cys Met Asp Asp Ala Lys Leu Arg Arg Gly Arg Pro Thr Ile His	
100 105 110	

23		24
TCT CAT TAC GGA GAG CAT GTG GCA ATA CTG GCG GCG GTT GCC TTG CTG	384	
Ser His Tyr Gly Glu His Val Ala Ile Leu Ala Ala Val Ala Leu Leu		
115 120 125		
AGT AAA GCC TTT GCG GTA ATT GCC GAT GCA GAT GCG CTC ACG CCG CTG	432	
Ser Lys Ala Phe Gly Val Ile Ala Asp Ala Asp Gly Leu Thr Pro Leu		
130 135 140		
GCA AAA AAT CCG GCG GTT TCT GAA CTG TCA AAC GCC ATC GCG ATG CAA	480	
Ala Lys Asn Arg Ala Val Ser Glu Leu Ser Asn Ala Ile Gly Met Gln		
145 150 155 160		
GGA TTG GTT CAG GGT CAG TTC AAG GAT CTG TCT GAA GCG GAT AAG CCG	528	
Gly Leu Val Gln Gly Gln Phe Lys Asp Leu Ser Glu Gly Asp Lys Pro		
165 170 175		
GGC ACC GCT GAA GCT ATT TTG ATG ACG AAT CAC TTT AAA ACC AGC ACG	576	
Arg Ser Ala Glu Ala Ile Leu Met Thr Asn His Phe Lys Thr Ser Thr		
180 185 190		
CTG TTT TGT GCC TCC ATG CAG ATG GCC TCG ATT GTT GCG AAT GCC TCC	624	
Leu Phe Cys Ala Ser Met Gln Met Ala Ser Ile Val Ala Asn Ala Ser		
195 200 205		
AGC GAA GCG CGT GAT TGC CTG CAT CGT TTT TCA CTT GAT CTT GGT CAG	672	
Ser Glu Ala Arg Asp Cys Leu His Arg Phe Ser Leu Asp Leu Gly Gln		
210 215 220		
GCA TTT CAA CTG CTG GAC GAT TTG ACC GAT GCG ATG ACC GAC ACC GGT	720	
Ala Phe Gln Leu Leu Asp Asp Leu Thr Asp Gly Met Thr Asp Thr Gly		
225 230 235 240		
AAG GAT AGC AAT CAG GAC GCC GGT AAA TCG ACG CTG GTC AAT CTG TTA	768	
Lys Asp Ser Asn Gln Asp Ala Gly Lys Ser Thr Leu Val Asn Leu Leu		
245 250 255		
GGC CCG AGG GCG GTT GAA GAA CGT CTG AGA CAA CAT CTT CAG CTT GCC	816	
Gly Pro Arg Ala Val Glu Glu Arg Leu Arg Gln His Leu Gln Leu Ala		
260 265 270		
AGT GAG CAT CTC TCT GCG GCC TGC CAA CAC GCG CAC GCC ACT CAA CAT	864	
Ser Glu His Leu Ser Ala Ala Cys Gln His Gly His Ala Thr Gln His		
275 280 285		
TTT ATT CAG GCC TCG TTT GAC AAA AAA CTC GCT GCC GTC AGT TAA	909	
Phe Ile Gln Ala Trp Phe Asp Lys Lys Leu Ala Ala Val Ser *		
290 295 300		

【 0 0 3 9 】 配列番号 : 5

配列の長さ : 1 4 7 9

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

* 起源 :

生物名 : Erwinia uredovora

配列の特徴 :

40 他の情報 : crtI (遺伝子名)

*

配列

ATG AAA CCA ACT ACG GTA ATT GGT GCA GCG TTC GGT GCG CTG GCA CTG	48
Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu	
1 5 10 15	
GCA ATT CGT CTA CAA GCT GCG GCG ATC CCC GTC TTA CTG CTT GAA CAA	96
Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln	
20 25 30	
CGT GAT AAA CCC GCG GGT CCG GCT TAT GTC TAC GAG GAT CAG GCG TTT	144
Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe	

25																26	
35					40					45							
ACC	TTT	GAT	GCA	GGC	CCG	ACG	GTT	ATC	ACC	GAT	CCC	AGT	GCC	ATT	GAA	192	
Thr	Phe	Asp	Ala	Gly	Pro	Thr	Val	Ile	Thr	Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu		
50					55					60							
GAA	CTG	TTT	GCA	CTG	GCA	GGA	AAA	CAG	TTA	AAA	GAG	TAT	GTC	GAA	CTG	240	
Glu	Leu	Phe	Ala	Leu	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Tyr	Val	Glu	Leu		
65					70					75					80		
CTG	CCG	GTT	ACG	CCG	TTT	TAC	CGC	CTG	TGT	TGG	GAG	TCA	GGG	AAG	GTC	288	
Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Phe	Tyr	Arg	Leu	Cys	Trp	Glu	Ser	Gly	Lys	Val		
85					90					95							
TTT	AAT	TAC	GAT	AAC	GAT	CAA	ACC	CGG	CTC	GAA	GCG	CAG	ATT	CAG	CAG	336	
Phe	Asn	Tyr	Asp	Asn	Asp	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu	Ala	Gln	Ile	Gln	Gln		
100					105					110							
TTT	AAT	CCC	CGC	GAT	GTC	GAA	GGT	TAT	CGT	CAG	TTT	CTG	GAC	TAT	TCA	384	
Phe	Asn	Pro	Arg	Asp	Val	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Phe	Leu	Asp	Tyr	Ser		
115					120					125							
CGC	GCG	GTG	TTT	AAA	GAA	GGC	TAT	CTA	AAG	CTC	GGT	ACT	GTC	CCT	TTT	432	
Arg	Ala	Val	Phe	Lys	Glu	Gly	Tyr	Leu	Lys	Leu	Gly	Thr	Val	Pro	Phe		
130					135					140							
TTA	TCG	TTC	AGA	GAC	ATG	CTT	CGC	GCC	GCA	CCT	CAA	CTG	GCG	AAA	CTG	480	
Leu	Ser	Phe	Arg	Asp	Met	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu		
145					150					155					160		
CAG	GCA	TGG	AGA	AGC	GTT	TAC	AGT	AAG	GTT	CCC	AGT	TAC	ATC	GAA	GAT	528	
Gln	Ala	Trp	Arg	Ser	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Tyr	Ile	Glu	Asp		
165					170					175							
GAA	CAT	CTG	CGC	CAG	CCG	TTT	TCT	TTC	CAC	TCG	CTG	TTG	GTG	GCG	GCG	576	
Glu	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Phe	His	Ser	Leu	Leu	Val	Gly	Gly		
180					185					190							
AAT	CCC	TTC	GCC	ACC	TCA	TCC	ATT	TAT	ACG	TTG	ATA	CAC	GCG	CTG	GAG	624	
Asn	Pro	Phe	Ala	Thr	Ser	Ser	Ile	Tyr	Thr	Leu	Ile	His	Ala	Leu	Glu		
195					200					205							
CGT	GAG	TGG	GGC	GTC	TGG	TTT	CCG	CGT	GGC	GGC	ACC	GGC	GCA	TTA	GTT	672	
Arg	Glu	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Pro	Arg	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Val		
210					215					220							
CAG	GCG	ATG	ATA	AAG	CTG	TTT	CAG	GAT	CTG	GGT	GCG	GAA	GTC	GTG	TTA	720	
Gln	Gly	Met	Ile	Lys	Leu	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Val	Val	Leu		
225					230					235					240		
AAC	GCC	AGA	GTC	AGC	CAT	ATG	GAA	ACG	ACA	GGA	AAC	AAG	ATT	GAA	GCC	768	
Asn	Ala	Arg	Val	Ser	His	Met	Glu	Thr	Thr	Gly	Asn	Lys	Ile	Glu	Ala		
245					250					255							
GTG	CAT	TTA	GAG	GAC	GGT	CCC	AGG	TTC	CTG	ACG	CAA	GCC	GTC	GCG	TCA	816	
Val	His	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Thr	Gln	Ala	Val	Ala	Ser		
260					265					270							
AAT	GCA	GAT	GTG	GTT	CAT	ACC	TAT	CGC	GAC	CTG	TTA	AGC	CAG	CAC	CCT	864	
Asn	Ala	Asp	Val	Val	His	Thr	Tyr	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	His	Pro		
275					280					285							
CCC	GCG	GTT	AAG	CAG	TCC	AAC	AAA	CTG	CAG	ACT	AAG	CGC	ATG	AGT	AAC	912	
Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Lys	Leu	Gln	Thr	Lys	Arg	Met	Ser	Asn		
290					295					300							
TCT	CTG	TTT	GTG	CTC	TAT	TTT	GGT	TTG	AAT	CAC	CAT	CAT	GAT	CAG	CTC	960	

27		28
Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu		
305	310	315
CGC CAT CAC ACG GTT TGT TTC GCC CCG CGT TAC CCC GAG CTG ATT GAC	1008	
Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp		
325	330	335
GAA ATT TTT AAT CAT GAT GGC CTC GCA GAG GAC TTC TCA CTT TAT CTG	1056	
Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu		
340	345	350
CAC CGC CCC TGT GTC ACG GAT TCG TCA CTG CCG CCT GAA GGT TGC GGC	1104	
His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly		
355	360	365
AGT TAC TAT GTG TTG CCG CCG GTG CCG CAT TTA GCC ACC GCG AAC CTC	1152	
Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu		
370	375	380
GAC TGG ACG GTT GAG GCG CCA AAA CTA CGC GAC CGT ATT TTT GCG TAC	1200	
Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr		
385	390	395
CTT GAG CAG CAT TAC ATG CCT GCC TTA CCG AGT CAG CTG GTC ACG CAC	1248	
Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His		
405	410	415
CGG ATG TTT ACG CCG TTT GAT TTT CCG GAC CAG CTT AAT GCC TAT CAT	1296	
Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His		
420	425	430
GCC TCA GCC TTT TCT GTG GAG CCC GTT CTT ACC CAG AGC GCC TGG TTT	1344	
Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe		
435	440	445
CGG CCG CAT AAC CCG GAT AAA ACC ATT ACT AAT CTC TAC CTG GTC GGC	1392	
Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly		
450	455	460
GCA GCC ACG CAT CCC GGC GCA GGC ATT CCT GGC GTC ATC GGC TCG GCA	1440	
Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala		
465	470	475
AAA CCG ACA GCA GGT TTG ATG CTG GAG GAT CTG ATT TGA	1479	
Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile *		
485	490	

【 0 0 4 0 】 配列番号 : 6

配列の長さ : 1 1 4 9

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

* 起源 :

生物名 : Erwinia uredovora

配列の特徴 :

他の情報 : crtY (遺伝子名)

* 40

配列

ATG CAA CCG CAT TAT GAT CTG ATT CTC GTG GCG GCT GGA CTC GCG AAT	48
Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu Ala Asn	
1	5
GCG CTT ATC GCC CTG CGT CTT CAG CAG CAG CAA CCT GAT ATG CGT ATT	96
Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Gln Pro Asp Met Arg Ile	
20	25
TTG CTT ATC GAC GCC GCA CCC CAG GCG GCG GCG AAT CAT ACG TGG TCA	144
Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr Trp Ser	
35	40
	45

29	30
TTT CAC CAC GAT GAT TTG ACT GAG AGC CAA CAT CGT TGG ATA GCT CCG	192
Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile Ala Pro	
50 55 60	
CTG GTG GTT CAT CAC TGG CCC GAC TAT CAG GTA CCG TTT CCC ACA CCG	240
Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro Thr Arg	
65 70 75 80	
CGT CGT AAG CTG AAC AGC GGC TAC TTT TGT ATT ACT TCT CAG CGT TTC	288
Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln Arg Phe	
85 90 95	
GCT GAG GTT TTA CAG CGA CAG TTT GGC CCG CAC TTG TGG ATG GAT ACC	336
Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met Asp Thr	
100 105 110	
CCG GTC GCA GAG GTT AAT CCG GAA TCT GTT CCG TTG AAA AAG GGT CAG	384
Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys Gly Gln	
115 120 125	
GTT ATC GGT CCC CCG CCG GTG ATT GAC GGC CCG GGT TAT CCG GCA AAT	432
Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala Ala Asn	
130 135 140	
TCA GCA CTG AGC GTG CCG TTC CAG CCG TTT ATT GGC CAG GAA TGG CGA	480
Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu Trp Arg	
145 150 155 160	
TTG ACC CAC CCG CAT CGT TTA TCG TCT CCC ATT ATC ATG GAT GCC ACG	528
Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp Ala Thr	
165 170 175	
GTC GAT CAG CAA AAT CGT TAT CCG TTC GTG TAC ACC CTG CCG CTC TCG	576
Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro Leu Ser	
180 185 190	
CCG ACC AGA TTG TTA ATT GAA GAC ACG CAC TAT ATT GAT AAT GCG ACA	624
Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn Ala Thr	
195 200 205	
TTA GAT CCT GAA TGC CCG CCG CAA AAT ATT TGC GAC TAT GCC CCG CAA	672
Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala Ala Gln	
210 215 220	
CAG GGT TGG CAG CTT CAG ACA CTG CTG CGA GAA GAA CAG GGC GCC TTA	720
Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly Ala Leu	
225 230 235 240	
CCC ATT ACT CTG TCG GGC AAT GCC GAC GCA TTC TGG CAG CAG CCG CCC	768
Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln Arg Pro	
245 250 255	
CTG GCC TGT AGT GGA TTA CGT GCC GGT CTG TTC CAT CCT ACC ACC GGC	816
Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr Thr Gly	
260 265 270	
TAT TCA CTG CCG CTG CCG GTT GCC GTG GCC GAC CCG CTG AGT GCA CTT	864
Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser Ala Leu	
275 280 285	
GAT GTC TTT ACG TCG GCC TCA ATT CAC CAT GCC ATT ACG CAT TTT GCC	912
Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His Phe Ala	
290 295 300	
CGC GAG CCG TGG CAG CAG CAG GCC TTT TTC CCG ATG CTG AAT CCG ATG	960
Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn Arg Met	


```

31                                     32
305                               310       315       320
CTG TTT TTA GCC GGA CCC GCC GAT TCA CGC TGG CCG GTT ATG CAG CGT 1008
Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met Gln Arg

          325               330               335
TTT TAT GGT TTA CCT GAA GAT TTA ATT GCC CGT TTT TAT CCG GGA AAA 1056
Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala Gly Lys

          340               345               350
CTC ACG CTG ACC GAT CCG CTA CGT ATT CTG AGC GCC AAG CCG CCT GTT 1104
Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro Pro Val

          355               360               365
CCG GTA TTA GCA GCA TTG CAA GCC ATT ATG ACG ACT CAT CGT TAA 1149
Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr His Arg *

          370               375               380

```

【0041】

【発明の効果】本発明による遺伝子は、種々の生物由来のβ-カロチンヒドロキシラーゼと同様の活性を持ちながら、これらのβ-カロチンヒドロキシラーゼとアミノ酸配列レベルで相同性を有さない酵素をコードするものであり、むしろβ-カロチンケトラゼとアミノ酸レベルで意義深い相同性を有していたことからすれば全く思いがけない配列と機能の関係を有するといえる。本発明により、β-カロチンを多く蓄積している微生物や植物に、本発明によるβ-カロチンヒドロキシラーゼ遺伝子を導入して、あるいはβ-カロチンを産生しない微生物や植物に本発明遺伝子をβ-カロチン合成に関*

20 *与する遺伝子と共に導入して、ゼアキサンチンやβ-クリプトキサンチンなどのキサントフィルに変換することができる。また、もともと従来型のβ-カロチンヒドロキシラーゼ遺伝子を有している微生物や植物に、本発明によるβ-カロチンヒドロキシラーゼ遺伝子を導入しても、相同組み換えやco-suppression等の問題を気にすることなく、これらの微生物や植物においてβ-カロチンヒドロキシラーゼ活性を付与または増大させることができ、その結果として、ゼアキサンチンやβ-クリプトキサンチン等のキサントフィルおよびこれらのキサントフィルの代謝物の生産量を増やすことができる。

フロンページの続き

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

F I

// (C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:89)

(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:18)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 23/00

C 1 2 R 1:19)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.